

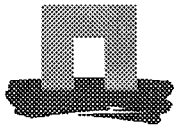


Cultivaridentificatie van bolgewassen

Een kort literatuuroverzicht van mogelijkheden met de nieuwste DNA-technieken

Joop van Doorn





Cultivaridentificatie van bolgewassen

Een kort literatuuroverzicht van mogelijkheden met de nieuwste DNA-technieken

Joop van Doorn

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Sector Bloembollen
Juni 2004
PPO nr. 330021

m.

© 2004 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Dit is een vertrouwelijk document, uitsluitend bedoeld voor intern gebruik binnen PPO dan wel met toestemming door derden. Niets uit dit document mag worden gebruikt, vermenigvuldigd of verspreid voor extern gebruik.



Projectnummer: 330021

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Sector Bloembollen

Adres : Prof.van Slogterenweg 2, Lisse
: Postbus 85, 2160 AB Lisse
Tel. : 0252 – 46 21 21
Fax : 0252 – 46 21 00
E-mail : infobollen.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.dlo.nl

Inhoudsopgave

pagina

1	INLEIDING	7
2	WAAROM CULTIVARIDENTIFICATIE BIJ BLOEMBOLGEWASSEN?	9
3	KORTE INVENTARISATIE VAN BESTAANDE TECHNIEKEN OM CULTIVARS TE IDENTIFICEREN	11
3.1	Opplant.....	11
3.2	Eiwit- en enzymtechnieken voor identificatie van rassen	11
4	MOLECULAIRE TECHNIEKEN.....	13
4.1	RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	13
4.2	RFLP (Restriction fragment Length Polymorphisms)	14
4.3	AFLP (Amplified Fragment-Length Polymorphisms).....	14
4.4	SNP (Single Nucleotide Polymorphisms)	15
4.5	Microsatellites	15
4.6	KOSTEN.....	16
5	MOGELIJKHEDEN VOOR DE IDENTIFICATIE VAN SPORTEN/MUTANTEN.....	17
6	CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	19
7	LITERATUUR.....	21

Samenvatting

Momenteel vindt cultivaridentificatie van bolgewassen overwegend plaats via morfologie, opplant en vakkennis van de telers. Een eenduidige vaststelling van de identiteit van een bolgewas cv is nuttig (maar niet altijd noodzakelijk) voor bescherming van kwekersrecht en voor de veredelaars het maken van geschikte kruisingen. Ook worden biochemische technieken toegepast, meestal eiwitpatroon- en enzymanalyse. In toenemende mate echter worden nucleinezuurfingerprint technieken (RNA,DNA) gebruikt. Deze streepjescodes van (meestal) het DNA van de cv blijken een hoog onderscheidend vermogen te hebben (RAPD, AFLP, SSR, SNP), maar vergen soms nogal wat vooronderzoek (SSR, SNP) en kunnen prijzig zijn.

AFLP, SSR en SNP lijken de beste technieken; cv's kunnen hiermee onderscheiden worden. Sporten (bv. kleurmutanten) kunnen nog niet onderscheiden worden met DNA-technieken. Een onderzoek bij de tulpecultivars Rode en Gele Apeldoorn liet geen verschillen zien.

1 Inleiding

Waarom wil men cultivars kunnen identificeren? Een eerste aspect is het eenduidig kunnen vaststellen dat men de juiste ouders gebruikt bij veredeling van gewassen. Verder is het van belang om cultivars ("cv's") waarover een dispuut bestaat reproduceerbaar en onomstotelijk te kunnen identificeren. Dit waarborgt de eigendomsrechten en kwekersrecht van de veredelaars of telers in kwestie. Morfologische identificatie is traditioneel en van oudsher, samen met fysiologische en kweektechnische beschrijvingen in gebruik. Dit is in veel gevallen onvoldoende, zeker wanneer derden een uitspraak moeten doen, en de ontwikkeling van nieuwe, nauw verwante cultivars. Er bestaan typeringsmethodieken, gebaseerd op de variatie in eiwitsamenstelling van de cv's. Deze zijn dan als streepjescode zichtbaar te maken. Hier zijn goede resultaten mee behaald. Nadeel kan echter zijn de mogelijke weefselafhankelijkheid en verschillen door variabele fysiologische condities naast de veelal beperkte aantallen bandenpatronen die vaak slecht reproduceerbaar zijn. Verder zijn deze technieken van belang voor kruisingen, waarbij de patronen van de ouders in de nakomelingen terug te vinden.

De voordelen van DNA fingerprints ("streepjescodes") kunnen zijn de onafhankelijkheid van leeftijd, type weefsel en milieu-invloeden; het aantal mogelijke markers is onbegrensd.

De fingerprints kunnen voorts zeer goed dienen bij de ondersteuning van patenteerbaarheid van nieuwe cv's maar ook ten behoeve van kruisingen die variatie tussen ouder cv's zichtbaar maken. Tevens zijn fingerprints als merkers bruikbaar om mutaties op te sporen binnen weefselkweek programma's. Door weefselkweekvermeerdering kunnen allerlei afwijkingen ontstaan.

Vaak bestaat er misverstand over het fenomeen cv identificatie en de raszuiverheid binnen een partij. In het laatste geval is een minder discriminerende methode en een statisch verantwoord aantal steekproeven voldoende om binnen een partij bollen verschillen aan te tonen.

Dit beknopte rapport beoogt via literatuuronderzoek, een aantal gesprekken met kenners uit het veld van cv-identificatie, en een door GeneTwister uitgevoerd experiment aan een aantal tulpen cv's inzicht te verschaffen aan de lezer wat de stand van zaken is inzake cv identificatie van bolgewassen wat betreft mogelijkheden en onmogelijkheden van de moderne DNA fingerprint technieken. GeneTwister heeft een beperkte analyse uitgevoerd van genen voorkomend in drie verschillende cultivars van tulp cv 'Apeldoorn', cv 'Leen vd Mark' en cv 'Prominence' waaronder twee sports van dezelfde cultivar Apeldoorn (rood en geel) met de vraagstelling of tussen de cultivars en de sports verschillen konden worden aangetoond. Gezien de snelle ontwikkelingen is dit rapport slechts een momentopname, en verdient het aanbeveling een dergelijke studie binnen afzienbare tijd te herhalen.

2 Waarom cultivaridentificatie bij bloembolgewassen?

Identificatie van cultivars is wenselijk om remplacering (verwisseling) te voorkomen en kwekersrecht te verzekeren. De situatie bij de bloembollen verschilt met die van de vaste planten. De cv's van vaste planten binnen deze sector zijn vaak niet goed beschreven zodat er bij de kweker en handelaar sprake kan zijn van verschillende partijen.

Een ander verschil met de bollen is, dat er bij de bloemisterij gekweekt wordt uit zaad en er dan vermeerderd wordt. Hierbij kunnen sneller verwisselingen plaatsvinden. Daarom is registratie bij deze sector meer algemeen goed.

Bij bol- en wortelstokgewassen is er verschil tussen registratie en kwaliteit. Dit is sectorafhankelijk en afhankelijk van de eisen die men stelt: bij bv. droogverkoop is registratie niet zo van belang; kwaliteitseisen kunnen worden gesteld bij export. Bij tulp luistert dit erg nauw.

Kwekersrecht is belangrijk voor bolgewassen die het goed doen in de broeierij; voor droogverkoop is het niet belangrijk. Voor kwekersrecht betaalde men fl. 2000,- eenmalig en fl 750 per jaar. Nadeel is dat dit veel geld is, en dit recht vaak niet veel zegt!

Voor de bloembollenhandel is de identificatie van belang voor de broei-, groei-eigenschappen en voor ziekte (resistentie e.d.). Uiteraard is dit ook van belang voor veredeling.

Wat van groot belang zou zijn voor alle siergewassen is de identificatie van een cultivarvariëteit met een andere kleur: sporten of mutanten. Dit is vooral van belang voor de gewassen tulp, iris en hyacint.

Er zijn nogal wat praktische problemen bij het identificeren van cultivars:

(a) Hebben we bij een gewas te maken met een kloon, of is het een mengsel? Ook bij kruising van identieke cv's kunnen er veranderingen ontstaan.

(b) De acceptatie van registratie bij bolgewassen is nog onvoldoende in tegenstelling tot wat bij voedingsgewassen en veel bloemisterijgewassen het geval is.

De KAVB werkt met referentie-parijen. Registratie moet nog door de UPOV worden geaccepteerd.

(c) Er zijn kwaliteitsproblemen. Is er sprake van een cv of een species?

(d) Er ontstaan ook soms afwijkingen zoals verkleuring, bosjesplanten, ook bij weefselkweek. Deze afwijkingen, met name verkleuring wijt men wel aan de "veroudering" van de cv.

Bij welke gewassen zou cultivaridentificatie het meest wenselijk zijn?

1. Bij de Muscari: allemaal blauw, maar verschillen in wanneer ze bloeien: van vroege tot minder vroege bloei.

Verwante zaaisels van LeFebre's ook niet uit elkaar te houden.

2. Bij iris: cv Silver Beauty lijkt sprekend op een andere cv.

3. Bij Hippeastrum zijn de cv's slecht te onderscheiden. Toepassing van identificatie bij droogverkoop is marginaal: hier kan geremplaceerd worden zonder sancties.

4. Problemen zijn vooral bij dahlia en gladiol. Snelle vermeerdering en veredeling is hier mogelijk.

Kwaliteitsnormen dienen hier opgesteld te worden om zo de (snelle) producten te testen.

5. Ook bij saffraankrokussen is kwaliteitsnormering handig om wel en niet-bloeiende partijen te onderscheiden. Dit zijn vaak populatie-verschillen.

6. Bij narcis komen heel veel cv's voor. Vastleggen hiervan is mogelijk zinvol. De kwaliteiten verschillen vaak (dubbele bloemen, bolmaat, slechte behandelingen, soms iets anders).

Ook kunnen monsters voor het scheidsgerecht via kwaliteitsnormering sneller en objectiever zijn dan via opplant. Door de toenemende aantallen cv's en afnemende aantal specialisten ontstaan problemen.

3 Korte inventarisatie van bestaande technieken om cultivars te identificeren

3.1 Opplant

Dit betreft morfologische karakterisatie van cv' s en instandhouden van standaard (referentie-) materiaal en wordt veel gebruikt door de KAVB samen met BKD. Nadeel: duurt lang (bv. van weefselkweekmateriaal) voordat eventuele remplacering of andere afwijkingen zichtbaar zijn naast de kosten van expertise, kasruimte en verzorging. Van bolgewassen als tulp is de generatietijd wel 4 jaar. Van sommige bolgewassen zijn de kweekcondities lastig.

Variëteiten binnen een partij worden opgeplant door de KAVB; de Darwinhybride-groepen worden wel bekeken door de BKD. Een database met informatie zou goed aangevuld kunnen worden met een fingerprint (1).

3.2 Eiwit- en enzymtechnieken voor identificatie van rassen

Deze berusten op verschillen in eiwitsamenstelling of activiteit (van enzymen). Voor vele gewassen is het kwekersrecht gebaseerd op morfologie en eiwittechnieken (enzymen e.d.). De identificatie berust vaak op het zichtbaar maken van deze eiwitten of enzymactiviteiten als streepjes. Hiervoor worden technieken gebruikt zoals iso-electrisch focussing, SDS-PAGE of (in combinatie met antisera) immunoblotting (19,20). Er is een aantal bedrijven die dit uitvoeren, zoals IdQ en Proteios. Ook de BKD past een aantal van deze technieken toe. Hoewel deze technieken vooral beschreven zijn voor tuinbouwgewassen (aardappel, grassoorten, gerst, cacteen, zuiverheid van zaadpartijen) (11), blijken deze streepjescodes ook goed toe te passen voor nerine- en lelieachtigen (21,22). Binnen een dag is de identiteit van een lelieras (mits opgenomen in een database van streepjescodes) en hierin terug te zoeken.

Voor tulp kunnen bijvoorbeeld kruisingen van darwinhybriden worden vastgesteld; sporten in principe niet. Het onderscheidende vermogen van deze eiwittechnieken hangt af van de aantallen eiwitbandjes die zichtbaar gemaakt kunnen worden; bij lelie vindt men meestal veel minder eiwitbandjes in vergelijking met tulp. Voor de bepaling van de raszuiverheid in een partij neemt men steekproefsgewijs een statistisch betrouwbaar aantal monsters, die vervolgens aan een van de eiwittechnieken worden onderworpen.

Voordeel van deze eiwittechnieken is, dat deze meestal goedkoper zijn dan DNA-technieken. Een nadeel is dat er zg. geografische variatie in patronen van deze eiwittechnieken gevonden wordt. Deze variatie is afhankelijk van in welk land het gewas geteeld wordt. Ook andere variatie, als gevolg van een veranderde eiwitexpressie kan optreden in een partij, terwijl het gaat om eenzelfde soort of ras van het gewas.

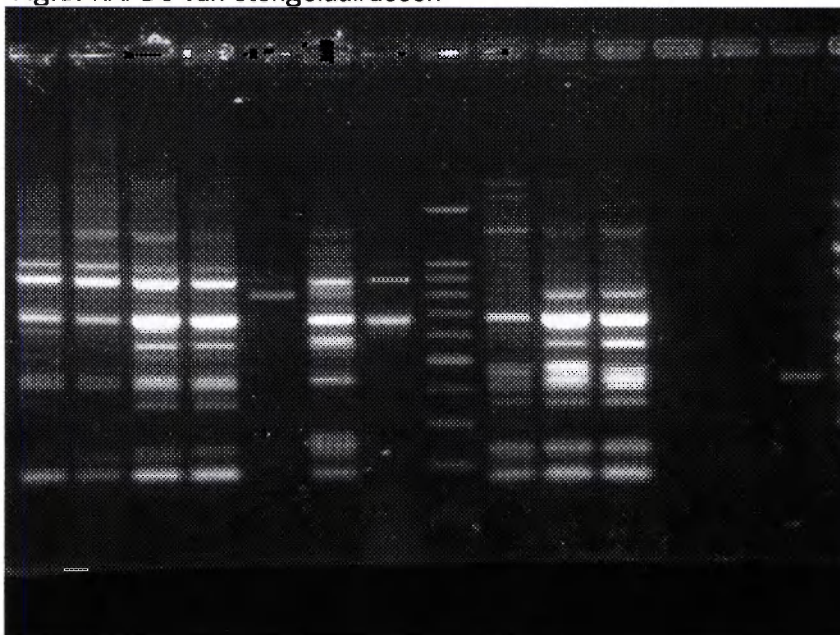
4 Moleculaire technieken

Het basisprincipe berust op het vinden van verschillen in streepjescodes: zichtbaar gemaakte DNA-fragmenten. Het verschil tussen de diverse DNA technieken berust op de mate van bewerkelijkheid van de toets en de voorkennis van het DNA waarom het gaat. Ook geeft de ene DNA techniek veel meer streepjes als de andere, maar is vaak moeilijker om uit te voeren. Deze technieken worden niet alleen voor identificatie, maar ook toegepast voor het vinden van zg. somaclonale mutaties na vermeerdering in weefselkweek verwantschappen tussen cultivars of het vinden van merkers voor veredelingsdoeleinden (koppeling van bepaalde DNA-fragmenten met gewenste of ongewenste eigenschappen). Er zijn voorbeelden waar met DNA-technieken voor bepaalde plantensoorten soortspecifieke merkers zijn gevonden. Er zal niet in detail op deze technieken worden ingegaan; als referentie hiervoor dient het handboek van Van Pelt-Verkuil 2001 (18).

4.1 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Deze techniek berust op het principe dat kleine stukjes kunstmatig gemaakt DNA (primers, 10 nucleotiden groot) op vergelijkbare plaatsen in het te onderzoeken genoom kunnen plakken (hybridiseren) en de tussenliggende stukken (indien niet te groot) vermenigvuldigd (geamplificeerd) kunnen worden met een DNA polymerase in de PCR-reactie (Polymerase Chain Reaction). RAPDs benodigen geen kennis vooraf van de genetica van de plant, benodigen weinig DNA, is simpel, snel en geeft vaak goed kleine verschillen tussen groepen organismen aan. Als voorbeeld is een figuur met RAPD-patronen van stengelaaltjes in bolgewassen opgenomen.

Fig.1: RAPDs van stengelaalrassen



RAPDs worden gebruikt voor identificatiedoeleinden, zoals voor broccoli en bloemkool (7). Ook voor genetische analyse voor het vinden van DNA-merkers van weerstand van planten tegen bepaalde ziektes of om variatie binnen cellijnen, gekweekt onder verschillende fysiologische condities (2) genetische variatie vast te leggen. RAPDs gebruikt men ook bij monocotylen zoals bolgewassen (3). Over het gebruik van RAPDs om variatie in planten te vinden is het nodige bekend (12); nadeel is de vaak lastige

reproduceerbaarheid en het opzetten van een databank met deze wat variabele streepjescodes. Andere nadelen van RAPDs zijn hun relatief beperkte "oplossend vermogen" (meest geschikt voor relatief grote verschillen op te sporen) en de optredende variatie in signaal (afhankelijk van bv type apparatuur, gebruikte chemicaliën en persoonlijke behandeling).

4.2 RFLP (Restriction fragment Length Polymorphisms)

Deze techniek benodigt relatief veel DNA, dat geknipt wordt door restrictie-enzymen. De bandenpatronen moeten vaak zichtbaar gemaakt worden met behulp van een radioactief label. Vaak wordt een bepaald DNA fragment, bijvoorbeeld ribosomale genen, vermenigvuldigd middels PCR, om daarna geknipt te worden. Verschillen in patronen kunnen verschillen op soortniveau zichtbaar maken. Deze techniek wordt veel gebruikt in combinatie met andere DNA technieken (18). Een voorbeeld van RFLP's is te zien in figuur 2.

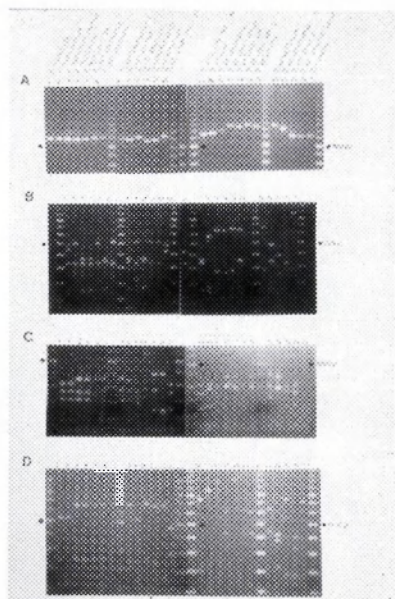


Fig. 2: DNA-knippatronen van 25 verschillende *Pythium*-soorten

4.3 AFLP (Amplified Fragment-Length Polymorphisms)

Dit is een robuuste, betrouwbare DNA fingerprinting techniek, gebaseerd op de detectie van genomische restrictie-fragmenten door PCR vermenigvuldiging. Fijntuning (meer of minder banden) is mogelijk door de keuze van de specifieke primersets. Met AFLP kunnen bij *Pelargonium* zelfs fenotypisch identieke planten van elkaar onderscheiden worden (6). AFLP- markers kunnen opgenomen worden voor de toekenning van Plant breeder rights met het doel bescherming van niet alleen nieuwe cv's specifiek en effectiever te maken, maar ook voor breeding en de beschrijving van cv's (4,5,8). Nadeel is de toch wel bewerkelijke techniek en het feit dat er een patent (firma Keygene) op rust die algemene toepassing bemoeilijkt. Als voorbeeld van deze techniek: een figuur met AFLPs van de schimmel *Fusarium oxysporum* forma *specialis gladioli* (Fig.3) waarbij verschillende fysio's verschillen in streepjespatronen laten zien.

4.4 SNP (Single Nucleotide Polymorphisms)

Dit staat voor Single Nucleotide Polymorphisms: enkele basen verschil die met PCR zijn op te sporen in DNA fragmenten. Bij deze techniek heb je een doelwit-gen nodig waar al de nodige informatie (sequenties) van

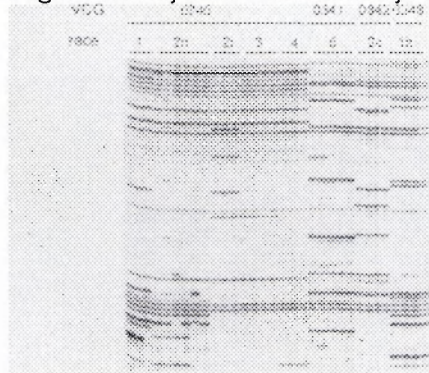


Fig.3. AFLP's van verschillende *Fusarium oxysporum*-isolaten in gladiool

bekend is. Vervanging van basen in DNA komt in de natuur regelmatig voor: zo'n 1 maal per 200-300 basen bij de mens. Als je rekent dat mensen 99.9% identiek aan elkaar zijn, is bekend dat hiervan 80% SNPs zijn. Veel SNP's worden als blokken overgeërfd (haplotypes). Door SNP profielen of haplotypen te bestuderen kan men relevante genen ophelderen die geassocieerd zijn met bepaalde eigenschappen of ziekten. Uiteindelijk, bij voldoende data, kan men dergelijke profielen als karakteristieken herkennen voor deze eigenschappen.

4.5 Microsatellites

Korte tandem repeats (Simple Sequence Repeats) komen ook veel voor in planten. Voor DNA-profielen van cv's en accessions kunnen op microsatellites gebaseerde primers goed voldoen (9). Voorbeelden zijn tomaat (*Lycopersicon esculentum*) en *Dianthus* (10). Primers voor sequence-tagged microsatellite sites zijn handig door de bestaande bibliotheken voor microsatellites te screenen. Daarna kunnen primers ontworpen worden en PCR testen voor de mate van polymorfisme te onderzoeken; de beste (meeste banden en verschillen) worden dan gekozen. Je hebt een probleem als juist jouw interessante plantensoort geen library (DNA sequentie-bank) heeft!

Bij Plant Research International, businessunit Biodiversity is men betrokken bij rassenonderzoek, kwekersrecht en rassenlijsten van diverse gewassen (roos, anjer, enkele granen, populier, tomaat, en ook tulp; 13,14,15,16). In brede zin werkt men hier aan merkeronderzoek ten behoeve van biodiversiteitsonderzoek. De beste resultaten lijken microsatellites te geven, maar ook AFLP's en SNP's zijn goed bruikbaar. Wat betreft de microsatellites gaat het hier om zg. retrotransposons. De merkers zijn niet alleen als repeats goed te gebruiken voor rassenidentificatie, maar ook voor veredelingsdoeleinden. Nadeel kan zijn, dat er delen van het chromosoom zijn waar deze retrotransposons niet voorkomen (liggen in niet-coderende deel van het DNA). Dit kan worden ondervangen door (ook) AFLPs te gebruiken. SNP's zijn goed te gebruiken op DNA-chips in tegenstelling tot retrotransposons (geven als repeat maar 1 signaal en zijn dus dan moeilijk kwantitatief te maken).

Het nadeel van retrotransposons is, dat voor elk genus men opnieuw moet zoeken (met behulp van verrijking door middel van Southern blots met repeat eraan; repeats blijven plakken uit genomisch RNA – verrijking tot 50%.

4.6 KOSTEN

De meest voorkomende kosten zijn die van opplant; deze zijn per gewas verschillend. Bij de KAVB betaalt men ongeveer 50€; voor tulpen is dit ongeveer 150€. De BKD hanteert een tarievenlijst: voor 10 monsters soortechtheid van tulp wordt ongeveer 133 € berekend.

De prijs voor de aanmelding van nieuwe (tulpen-) cultivars bedraagt ongeveer 150€ (KAVB).

De kosten van DNA-analyses verschillen per techniek en per instantie die deze uitvoeren. PPO voert deze onderzoeken uit als Tweedelijsdiagnostiek; een DNA streepjescode (bv. detectie van pathogene organismen), afhankelijk van het aantal en controles kost 50-100 €.

5 Mogelijkheden voor de identificatie van sporten/mutanten

Voor een rassenlijst zou het handig zijn om merkers te vinden die cultivars kunnen onderscheiden die niet echt verwant zijn (RAPDs) of meer verwant zijn (AFLP) of zelfs op sport niveau onderscheidend zouden kunnen zijn. Misschien komen hier kleurgene analyses voor in aanmerking. Er is al veel bekend over de flavonoïde (en speciaal de anthocyaan-) metabolische route die betrokken is bij de aanmaak van kleuren in planten. De hier geproduceerde secundaire metabolieten spelen een rol bij bescherming van de plant tegen UV, tegen stress en natuurlijk bij de pigmentatie. Anthocyanen zorgen voor de schakeringen rood-oranje-blauw. Over de carotenoïde route is minder van bekend.

In de literatuur komen steeds meer gegevens over de metabole routes in bloembladeren die leiden tot de verschillende kleuren. Bij Forsythia, een geelbloemige struik hoopt zich in de bloembladeren grote hoeveelheden carotenoiden maar mist anthocyanen. Voor bv. veredeling heeft men via transformatie-experimenten anthocyaansynthese geïnduceerd om zo de routes naar de synthese van rode componenten te verkennen (17). De kleur is een belangrijk aspect om tulpen te veredelen. De pigmenten bestaan hoofdzakelijk uit mengvormen van pelargonidine-, cyanidine- en delphinidine-glycosides.

Om te bezien wat nu de mogelijkheden zijn om binnen de tulp te onderzoeken is een experiment opgezet. Er bestaan verschillende groepen tulpen: Darwin, darwinhybride, triumpf, fosteriana, kaufmanniana, parkiet, praestans enz. De cultivar Apeldoorn is een zg. darwinhybride, aantal chromosomen is 36, en een kruising van darwintulp met Madame Lefebvre.

In hoeverre is nu cultivartypering mogelijk is op grond van verschillen tussen soorten (onderscheid maken tussen de cultivars 'Apeldoorn' en 'Leen van de Mark' / 'Prominence' (niveau I) en de cultivars 'Leen van de Mark' en 'Prominence' (niveau II)? Vervolgens zullen wij nagaan of daarmee polymorfismen kunnen worden gedetecteerd in sports van een bepaalde cultivar (niveau III). Het uiteindelijke doel is om in bepaalde, met kleur geassocieerde genen DNA-merkers te ontwikkelen en te testen in PCR.

Er is een beperkte analyse uitgevoerd van genen voorkomend in drie verschillende cultivars van tulp cv 'Apeldoorn', cv 'Leen vd Mark' en cv 'Prominence' waaronder twee sports van dezelfde cultivar Apeldoorn (rood en geel) met de vraagstelling of tussen de cultivars en de sports verschillen konden worden aangetoond.

Uit ongeveer duizend genen is er een kleine honderd geselecteerd voor sequentie analyse.

Op basis van de partiële sequenties zijn primersets ontworpen. Een beperkt aantal primersets is in de verschillende cultivars getest op fragmentpatronen.

Op basis van deze patronen kon helaas geen onderscheid gemaakt worden de cultivars, noch tussen de sports (fig.4). Het betreft een aantal experimenten van PCR's die zijn uitgevoerd met primersets van geselecteerde genen die succesvol leken voor de detectie van verschillen tussen Leen vd Mark, Prominence en Apeldoorn rood/geel. De volgorde van de monsters DNA is van links naar rechts telkens Leen vd Mark, Prominence, Apeldoorn rood en Apeldoorn geel.

De verwachting was dat de fragmentlengte dan wel de fragmentopbrengst per cultivar zou kunnen variëren; echter, de fragmentlengte (100-150bp) varieerde in geen enkele van de uitgevoerde PCR's. In deze figuur kan wel enige variatie in de opbrengst van het fragment van gen O27 (hoger) en het fragment van gen X15 (lager) waargenomen worden bij Leen vd Mark ten opzichte van de andere cultivars. Deze variatie is echter niet erg groot.

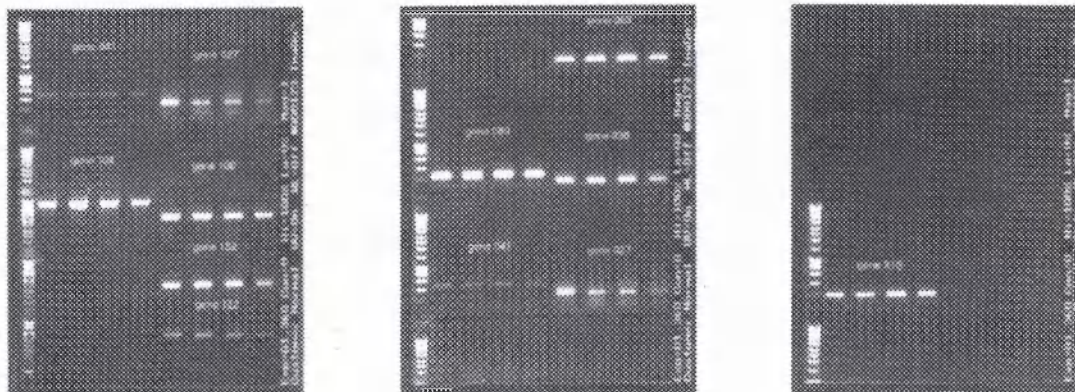


Fig. 4. Agarose gel van PCR fragmenten afkomstig van tulpengenen voor het aantonen van lengte en/of intensiteits verschillen in cvs 'LvdMark', 'Prominence' en 'Apeldoorn'. Van links naar rechts: lengte markers, fragmenten van LvdMark, Prominence, Apeldoorn-rood en Apeldoorn-geel (genen 041, 104,, 080, X15) en fragmenten van LvdMark, Prominence, Apeldoorn-rood en Apeldoorn-geel (genen 027, 100, 152, 122, 063, 039 en 027).

Uitgangspunt was dat tussen de verder uit elkaar staande cultivars zoals cv 'Prominence', cv 'Leen van de Mark' en cv 'Apeldoorn' duidelijke verschillen aantoonbaar zouden moeten zijn. Verwacht werd dat tussen de sports van cv Apeldoorn in veel mindere mate een verschil aantoonbaar zou zijn. Als basis is het functionele gebied van de genen gebruikt aangezien deze gebieden al beschikbaar waren.

Gebleken is echter dat op basis van de fragmentgrootte van de geselecteerde genen tussen de eerder genoemde cultivars geen verschil kon worden aangetoond. Ook tussen de sports niet, wat op voorhand aannemelijk was gezien het geringe aantal mutaties dat kan leiden tot een eventueel kleurverschil in deze sports. De oorzaak voor de afwezigheid van verschillen ligt waarschijnlijk in het feit dat exons voor de analyse zijn gebruikt, terwijl verschillen vooral in de introns zullen liggen. Analyse van deze gebieden was in de proefopzet niet meegenomen.

Voor verdere analyse van de geselecteerde genen is daarom wellicht een meer gedetailleerde sequentie analyse noodzakelijk dan op grond van het budget mogelijk was.

Hoewel de onderliggende methodiek zeer geschikt is voor opsporing van expressieverschillen tussen cultivars, hebben voor een snelle identificatie van DNA gebaseerde verschillen andere benaderingen de voorkeur, zoals RAPD- gebaseerde en AFLP-technieken.

Hierbij dient nog aangetekend te worden dat het aantonen van verschillen tussen cultivars wezenlijk anders is dan het vaststellen van identiteiten. In het laatste geval dienen voldoende fenotypische en genotypische gegevens verkregen met geformaliseerde protocollen, beschikbaar te zijn voor alle geregistreerde cultivars ten einde een betrouwbare uitspraak mogelijk te maken.

Voor het vaststellen van identiteiten hebben daarom mede in verband met het kostenaspect technieken als AFLP mogelijk de voorkeur.

6 Conclusies en aanbevelingen

1. Microsatellites, SNPs, AFLPs en in mindere mate RAPDs zijn geschikt om cultivars te identificeren. De voorkeur gaat uit naar microsatellites en mogelijk SNPs.
2. Sporten en puntmutaties zijn in principe niet op te sporen zonder kennis (locatie) vooraf.
3. Databases zijn op te zetten met deze “streepjescodes-genererende” technieken.
4. AFLP is een specialistische techniek waar een patent op rust voor commerciële toepassingen (Keygene). Microsatellites lijken geschikter mits er sequentiegegevens van het doelwitorganisme (in dit geval de tulp of lelie) bekend zijn. Bij onbekendheid (bv bij tulp) dienen deze eerst opgespoord te worden uit genomische banken wat vrij veel tijd kan kosten. Ook bij SNPs moet een doelwit-gen worden uitgekozen; voordeel is dat deze massaal toepasbaar zijn met behulp van microarrays. Ondanks problemen met hun reproduceerbaarheid kunnen RAPDs als eerste stap in identificatie bruikbaar zijn.
5. In het geval dat men meer weet over bepaalde kleurgenen van een siergewas zou het theoretisch mogelijk zijn om gericht naar sporten te zoeken. Men moet wel in het achterhoofd houden dat een kleur vaak door meerdere genen tot stand komt; een puntmutatie is vaak al genoeg om een andere kleur te krijgen door uitschakeling van een product in de keten van reacties die leiden tot de bloemkleur. De kleur rood is vaak geassocieerd met de metabole anthocyaanroute in planten; de genen hiervoor worden geacht geconserveerd te zijn in angiospermen. Voor bepaalde kleurvarianten zou men dan gericht genen kunnen isoleren en testen op veranderingen (Koes). Een onderzoek bij tulp, gericht om in een aantal veelbelovende, met kleur geassocieerde genen verschillen op te sporen tussen sporten van Apeldoorn leverde geen verschillen op. Wellicht kunnen we in de komende 10 jaar door de toenemende kennis van allerlei genen door het toenemende aantal genoomprojecten van bepaalde gewassen een doorbraak verwachten.

Met dank aan J. van Scheepen (KAVB), R.Smolders (PRI) T. van Schadewijk (BKD) en anderen voor hun medewerking aan interviews.

Literatuur

1. Thomas MR, P Cain and NS Scott. 1994. DNA typing of grapevines. A universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness. *Plant Mol. Biol.* 25:939-949.
2. Bogani P, A Simoni, P.Lio, A Scialpi, M Buiatti. 1996. Genome flux in tomato cell clones cultured in vitro in different physiological equilibria II. A RAPD analysis of variability. *Genome* 39:846-853.
3. Mitra S, PC Bhowmik and A Idmurr. 2000. Using RAPD Markers to identify genetic variation in quackgrass (*Elytrigia repens*) biotypes. *Ann. Appl. Biol.* 136:253-258.
4. Bachem CW, RS van den Hoeven, SM de Bruijn, D. Vreugdenhil, M Zabeau and RG Visser. 1996. Visualization of differential gene expression using novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J.* 9:745-753.
5. Vos P, R.Hogers, M Bleeker, M Reijans, T van de Lie, M Hornes, A Frijters, J Pot, J Pelemans, M Kuiper and M Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acid Res.* 23:4407-4414.
6. Barcaccia G, E Albertini, and M Falcinelli 1999. AFLP fingerprinting in *Pelargonium peltatum*: its development and potential in cultivar identification. *J Hort Sci & Biotechnol.* 74:243-250
7. Hu .J and CFQuiros 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers *Plant Cel Reports* 10: 505-511
8. Ranamukhaarachchi, DG, ME Kane, CLGuy and QB Li. 2000. Modified AFLP technique for rapid genetic characterization in plants. *BioTechniques* 29:858-866
9. Smulders, MJM, G. Bredemijer, W.Rus-Kortekaas, P. Arens and B. Vosman. 1997. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theor. Appl. Genet* 97:264-272
10. Smulders MJM, W Rus-Kortekaas and B Vosman. 2000. Microsatellite markers useful throughout the genus *Dianthus*. *Genome* 43:208-210.
11. O'Leary MC and TH Boyle. 1999. Cultivar identification and genetic diversity within a *Hatiora* (cactaceae) clonal germplasma collection using isoenzymes. *J Amer Soc Hort Sci* 124:373-376.
12. Newbury, HJ and BV Ford-Lloyd 1993. The use of RAPD for assessing variation in plants. *Plant Growth Regulation* 12:43-51.
13. Smulders MJM,, J van der Schoot, P Arens, en B Vosman. 2001. Trinucleotide repeat microsatellite markers for black poplar : *Molecular Ecology Notes* 1:188-190.
14. Arens P, H Coops, J Jansen, and B Vosman. 1998. Molecular genetics of black poplar : *Molecular Ecology* 7:11-18
15. Wiel, Clemens van de, Paul Arens, and Ben Vosman. 1999. Microsatellite retrieval in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Genome* 42: 139-149
16. Bredemeijer GMM, P Arens, P Wouters, D Visser, en B Vosman. 1998. The use of semi-automated fluorescent microsatellite analysis for tomato culture identification: *Theor Appl Genet* 97:584-590.
17. Quattrocchio, F., J Wing, K vanderwoude, E Souer, N de Vetten, J Mol and R. Koes. 1999 Molecular analysis of the anthocyanin2 Gene of *Petunia* and its role in the evolution of flower color. *The Plant Cell* 11: 1433-1444.
18. Van Pelt-Verkuil E, MF van Berlo, A van Belkum HGM Niesters. 2001. Moleculaire diagnostiek. Bohn Stafleu van Loghum, Houten
19. Weiss, W, W.Postel and A Görg. 1991 Barley cultivar discrimination: I. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and glycoprotein blotting. *Electrophoresis* 12: 323-330
20. Weiss, W, W Postel and A Görg. 1991 Barley cultivar discrimination: II. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectric focusing with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 12: 330-337
21. Booi G 1998. Snelle controle op identiteit lelie. *Handelswijzer* 1: 10-12.
22. Dwarswaard A 1993. Soortechtheid in een dag bekend. *Bloembollencultuur* 14: 16-17.

